

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-040367

(43)Date of publication of application : 10.02.1992

(51)Int.Cl.

G01N 30/48
B01D 15/08
B01J 20/26

(21)Application number : 02-145310

(71)Applicant : MITSUI TOATSU CHEM INC

(22)Date of filing : 05.06.1990

(72)Inventor : OKAWA KOHEI
FUJIKAKE SHIRO
HIDACHI KIYOSHI
YAMASHITA HITOSHI

(54) SPHERICAL SEPARATING AGENT

(57)Abstract:

PURPOSE: To improve pressure resistance, mechanical strength, alkali resistance, separability, etc., by bonding a hydrophilic epoxy resin to a hydrophobic spherical polymer carrier introduced with an amino group, then immobilizing a ligand into the remaining epoxy group.

CONSTITUTION: The hydrophobic spherical polymer carrier obtd. by allowing a perforating agent which is soluble in monomers but is insoluble in the formed polymers to coexist at 0.5 to 5 times the total weight of the monomers is treated with ammonia or is acted with a compd., such as aliphatic diamine or aromatic diamine, having plural pieces of amino groups in one molecule, by which the amino groups are introduced into the carrier at the time of suspension polymerizing. One or more kinds of the hydrophilic epoxy resins are then brought into contact therewith and the carrier is heated for about 3 hours at about 80 to 100° C, by which the epoxy groups and the amino groups are chemically bonded and the hydrophilic epoxy resin layer is formed on the surface of the hydrophobic spherical polymer. The unreacted epoxy groups remaining on the epoxy resin layer are immobilized by bringing the desired ligand into reaction. The separating agent having the sufficient pressure resistance, mechanical strength and separability is obtd. in this way.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報(A)

平4-40367

⑤Int. Cl.⁵

G 01 N 30/48
B 01 D 15/08
B 01 J 20/26

識別記号

P 7621-2 J
8014-4 D
L 2104-4 C

庁内整理番号

④公開 平成4年(1992)2月10日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全5頁)

⑭発明の名称 球状分離剤

⑰特 願 平2-145310

⑱出 願 平2(1990)6月5日

⑯発 明 者 大 川 浩 平 神奈川県川崎市高津区久末386-1
⑯発 明 者 藤 掛 史 朗 神奈川県横浜市栄区飯島町2089-5
⑯発 明 者 日 達 清 神奈川県横浜市神奈川区片倉1-17-33
⑯発 明 者 山 下 仁 神奈川県横浜市戸塚区矢部町1541-1-45
⑰出 願 人 三井東圧化学株式会社 東京都千代田区霞が関3丁目2番5号

明 細 書

1. 発明の名称

球状分離剤

2. 特許請求の範囲

(1)アミノ基を導入した親水性球状ポリマー担体に、親水性エポキシ樹脂を化学結合させ、しかるのち残余のエポキシ基にリガンドを固定化させることにより得られる球状分離剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明はクロマトグラフィー分離に用いられる分離剤に関し、さらに詳しくは水系でのクロマトグラフィー分離に際し、耐圧性、機械的強度にすぐれ、高速分離操作が可能で、かつ高分離能を有する球状分離剤に関する。

従来水系でのクロマトグラフィー分離操作にはセルロース、アガロース、デキストラン、キトサンなどの天然高分子を架橋ゲル化させた球状粒子およびポリアクリルアミド(共)重合体、ポリビニルアルコール(共)重合体、親水性ポリアクリル酸エステル(共)重合体などの合成高分子系架

橋球状ゲルが分離剤として用いられてきている。

これら親水性の強い分離剤は、水系での使用に際しては分離対象物質(基質)と疏水的な相互作用を持たず、非特異的な吸着を起こしにくい、基質の回収率が良いという利点を持っている。しかしながら上記分離剤は親水性であるがために水による膨潤が激しく、水系での使用の際、耐圧性、機械的強度が著しく低下してしまい、高速クロマトグラフィー分離操作が困難になる欠点を有している。ここで、かかる分離剤をクロマトグラフィーによる分離に使用する時は、通常、粒子の大きな分離剤を使用し、溶離液流による圧損失をできるだけ小さく抑え、カラム内に充填された分離剤の変形、破壊を防止して、クロマトグラフィー分離操作を可能にしている。しかしながらクロマトグラフィー分離においては充填された分離剤の粒子径が小さくなればなるほど分離能が向上するのである。かかる観点からすると従来の親水性の強い分離剤は耐圧性、機械的強度の制約から粒子径を小さくはできず、必然的にその分離

能も満足できる状態のものではないという欠点も持っている。

これら親水性の強い分離剤の水系での耐圧性、機械的強度を改善するには架橋密度をあげて、水による膨潤を抑えてやればよいが、かかる親水性の強い分離剤を用いてのクロマトグラフィー分離においては分離剤の架橋密度と分離能のあいだには密接な関係があり、架橋密度が上がり過ぎると逆に分離能が低下することが知られており、耐圧性、機械的強度、分離能が同時に改善された分離剤を得ることは、はなはだ困難であった。

疎水性の強いポリスチレン(共)重合体、ポリアクリル酸エステル(共)重合体を水系でのクロマトグラフィー分離操作の分離剤として用いると、耐圧性、機械的強度については問題はないが、基質との疏水の相互作用が強く、基質を吸着してしまったり、基質の回収率が悪いなどの問題がある。シリカゲルのような無機分離剤は、耐圧性、機械的強度が大きく、基質との非特異的な相互作用、吸着も起こりにくいので水系で使用する分離剤と

ると同時に、分離剤担体とリガンドの間に適当な長さを持つスペーサーを導入してやれば良いことなどを見出し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、アミノ基を導入した疎水性球状ポリマー担体に、親水性エポキシ樹脂を化学結合させ、しかるのち残余のエポキシ基にリガンドを固定化させることにより得られる球状分離剤を提供するものであり、本発明での球状分離剤は水系でのクロマトグラフィー分離操作に使用する時、特に有効である。

本発明で使用する疎水性球状ポリマー担体としては、スチレンを主成分としクロルメチル化スチレン、ジビニルベンゼンを共重合したもの、メチルメタアクリレートもしくはスチレンを主成分とし、ジビニルベンゼン、グリシジルメタアクリレートを共重合したものなど、疎水性の強いモノマーを使用して、懸濁重合で得られた球状ポリマー担体が例示されるが、なかんずく懸濁重合の際に、モノマー類には可溶であるが、生成するポリマーには不溶解である物質、例えば、脂肪族炭化水

素、高級脂肪族アルコール、高級脂肪酸およびそのエステル、アミド例えばジエチルベンゼン、ラウリル酸メチル等の多孔化剤をモノマー類の総重量の0.5～5倍重量、共存させて得られる多孔質の球状ポリマー担体が本発明に使用するのに最適である。なお、多孔化剤が0.5倍重量より少ないと、強度的に強いものが得られるが、多孔質化が不十分で比表面積が小さい担体となって仕舞う。また、多孔化剤が5倍重量より大きいと、多孔化剤の使用量の割には、比表面積が大きくなり、強度的に弱い担体になって仕舞うのが、通常である。

以上述べた如く、従来の水系でのクロマトグラフィー分離に使用された分離剤はそれぞれ一長一短があり、耐圧性、機械的強度、耐アルカリ性、分離能などの分離として要求される性能をすべてバランスよく満たすものは無いといえる状況下、本発明は水系でのクロマトグラフィー分離に適した、耐圧性、機械的強度、耐アルカリ性、分離能などの諸性能が著しく改善された分離剤を提供するものである。

本発明者らは水系でのクロマトグラフィー分離において分離剤に耐圧性、機械的強度、耐アルカリ性を付与するには疎水性球状ポリマー担体が適していること、基質と分離剤との疏水的な相互作用による吸着の制御、基質回収率の向上には分離剤表面を親水性の化合物で覆ってやれば良いこと、分離能を改善するには分離剤の粒子径を小さくす

る。これら疎水性球状ポリマー担体にアミノ基を導入するにはクロルメチル化スチレンを共重合した担体は、アンモニアで処理することによりアミノ基を導入でき、グリシジルメタアクリレートを共重合して得られた球状ポリマー担体にアミノ基を導入するには、これら担体に脂肪族ジアミン、芳香族ジアミンなどの1分子中に複数個のアミノ基を有する化合物、例えばエチレンジアミン、プロピ

レンジアミン、1,4-ブチレンジアミン、1,6-ヘキサメチレンジアミン、キシリレンジアミンなどを作用させると、担体上のオキシラン環との反応が容易に起き、担体にアミノ基を導入できる。また担体にアミノ基を導入するには、アミノ基含有モノマー例えばビニルアミン、2-アミノエチルメタアクリレートなどを懸濁重合時に共重合させてもよい。また疎水性球状ポリマー担体として、無孔質、多孔質いずれのものも使用することができる。担体へのアミノ基の導入量は、アミノ基量が以後のリガンドの固定化量を決定するので、できるだけアミノ基を多量に導入することが望ましい。導入後の担体の強度、導入方法の容易さなどを考慮した場合、0.01meq/gr～5.0meq/grの導入量が实际的である。

アミノ基を導入した疎水性球状ポリマー担体と化学結合させる親水性エポキシ樹脂として、ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル(なお、ポリエチレングリコール単位の重合度は2～30程度が望ましい。)ポリプロピレングリコールジ

グリシジルエーテル(ポリプロピレングリコール単位の重合度は2～30が望ましい。)ポリグリセリンポリグリシジルエーテル、ソルビトールポリグリシジルエーテルが例示されるが、水溶性であり、分子量に多孔質担体の孔内に拡散していくことができるエポキシ樹脂であればここに例示したもの以外のものも使用できる。

以上のごとく、親水性のエポキシ樹脂の種類以上を、アミノ基を導入した疎水性球状ポリマーと接触させ、80～100℃で3時間程度加熱してやると、容易にエポキシ樹脂のエポキシ基と、担体上に導入されたアミノ基との反応が起き、化学結合せしめることができ、疎水性球状ポリマーの表面に親水性のエポキシ樹脂層を形成できる。通常、このエポキシ樹脂層には未反応のエポキシ基が残っているので、このエポキシ基に所望のリガンドを反応させることにより、リガンドの固定化が可能である。すなわち、このエポキシ基を用いて、アミノ基、カルボキシル基、ヒドロキシル基などの活性水素を有する官能基を持つリガンドを固

定化できるのである。

水系の溶離液を用い、クロマトグラフィー分離を行う例として配位子交換クロマトグラフィー法があるが、これに用いられる分離剤としてアミノ酸とくにL-プロリン(もしくはD-プロリン)を担体に固定化したものが用いられている。従来の当該分離法に用いられてきた分離剤は前述したように耐圧性、機械的強度、耐アルカリ性、非特異的吸着性などクロマトグラフィー分離剤として要求される諸性能に一長一短があり、必ずしも満足のいくものでは無かった。本発明に従って製造した配位子交換クロマトグラフィー用分離剤は、従来の当該分離法に用いられた分離剤と比較して、基質の担体に対する非特異的な吸着が起きにくくなっていること、親水性のエポキシ樹脂が適当な長さのスペーサーになっていること、水系での使用でも十分な耐圧性、機械的強度を持っているため溶離液流による圧力損失での分離剤の変形、破壊が起きないなどの理由により、優れた分離能を持っている。

また水系の溶離液を用いるクロマトグラフィーとして、蛋白質などの分離、精製が代表的であるが、これに用いる分離剤としても、本発明による分離剤は、蛋白質と分離剤間の疎水性相互作用に基づく非特異的吸着が少なく、かつスペーサー効果によると考えられる分離能の向上も達成されており、優れたものになっている。

以下、実施例により、本発明をさらに具体的に説明する。

[疎水性球状ポリマー担体の合成]

(1)メチルメタアクリレート40重量部、ジビニルベンゼン40重量部、グリシジルメタアクリレート20重量部、ベンゾイルパーオキシド1.0重量部、多孔化剤としてラウリル酸メチル100重量部からなる原料溶液を、ポリビニルアルコール1.5重量%水溶液500重量部に分散させた。攪拌下85℃で8時間重合を行った後、球状ポリマーを濾過により分離し、よく水洗した。多孔化剤をアセトンで抽出し、多孔質の疎水性球状ポリマー担体を得た。(以後、担体Iと称する。)

(2) スチレン40重量部、ジビニルベンゼン40重量部、グリシジルメタアクリレート20重量部、ベンゾイルパーオキシド 1.0重量部、多孔化剤としてジエチルベンゼン70重量部、イソオクタン30重量部からなる原料溶液を、ポリビニルアルコール

1.5重量%水溶液 500重量部に分散させた。攪拌下85℃で12時間重合を行った後、球状ポリマーを濾過により分離し、良く水洗した。多孔化剤をアセトンで抽出し、多孔質の疎水性球状ポリマー担体を得た。(以後、担体2と称する。)

〔疎水性球状ポリマー担体へのアミノ基の導入〕

(1) 100ml 共栓付き三角フラスコに、担体1を10g、テトラヒドロフラン20ml、エチレンジアミン10gを秤取し、マグネチックスターラーでの攪拌下、60℃で8時間の反応を行った。反応終了後、濾過、洗浄を行い、アミノ基の導入された疎水性球状ポリマー担体を得た。アミノ基が0.7meq/g導入されていた(これを担体3とする)。

(2) 担体2についても、(1)と同様にしてエチレンジアミンを反応させ、アミノ基の導入された疎

水性球状ポリマー担体を得た。アミノ基が0.8meq/g導入されていた(これを担体4とする)。

〔親水性エポキシ樹脂とアミノ基を導入した疎水性ポリマー担体との化学結合法〕

デナコールE X 830(ポリエチレングリコールジグリシジルエーテル)5gを、水10mlに溶解し、しかる後アミノ基の導入された疎水性球状ポリマー5g(担体3)を加え、80℃で5時間反応させた。反応後、ポリマー担体を濾過でとりだし、洗浄を行い、未反応の親水性エポキシ樹脂などを洗い出した。担体上に0.6meq/grのエポキシ基が導入されていた。

実施例1

前述した工程を経て得られた親水性エポキシ樹脂が化学結合で固定化されている担体3を2g、共栓付き三角フラスコにとり、これにL-プロリン0.5g、トリエチルアミン0.5g、水10mlを加え、マグネチックスターラーの攪拌下60℃で3時間反応を行った。充分な洗浄後、固定化されていたL-プロリンを測定したところ、0.4meq/grの

L-プロリン(リガンド)が担体上に固定化されており、配位子交換クロマトグラフィー用の球状分離剤が得られた。

実施例2

親水性エポキシ樹脂が化学結合で固定化されている担体4についても、実施例1と同じ反応条件でL-プロリンをリガンドとして固定化し、配位子交換クロマトグラフィー用の球状分離剤を得た。固定化されたL-プロリンは、0.34meq/grであった。

比較例1

担体1にも、グリシジルメタアクリレートにもとづくエポキシ基が残っているので、これをそのまま用いてL-プロリンの固定化を試みた。L-プロリンの固定化反応条件は実施例1と同じにした。得られた配位子交換クロマトグラフィー用の球状分離剤は、L-プロリンの固定化反応が実施例1ほど進まず、実施例1の1/3程度の量のL-プロリンが固定されたにすぎなかった。

比較例2

市販されている配位子交換クロマトグラフィー用分離剤(商品名: CHIRO SOLVE JPS CHIMIE社製)を入手し、実施例1との比較試料とした。これはアクリルアミド、N-メチロール化アクリルアミド、架橋性モノマーを共重合し、さらにL-プロリンを固定化した親水性球状ゲルである。

〔評価結果〕

各配位子交換クロマトグラフィー用分離剤を下表の項目について評価を行った。

第1表

評価項目		実 施 例		比 較 例	
		1	2	1	2
耐 圧 性		>10	>10	>10	<0.5
分 離 能	R ₁	2.7	2.8	2.0	1.8
	R ₂	1.0	1.0	0.7	0.7
	R ₃	1.9	2.1	0.8	0.7

* 耐圧性は ml/minで表示した。

(評価結果説明)

耐圧性：比較例2の従来品は、溶離液量を0.5ml/min以上にすると、それによる液圧の為押し潰され、カラムの閉塞が起きる。

実施例1、2の本発明は、溶離液流量を10ml/min以上にしても、カラムの閉塞は起きず高速クロマト分離が可能である。

分離能：比較例2の従来品は、カラム内で充填剤が変形しているためか、分離能が悪い。なお、比較例1は、担体に直接リガンドの固定化が十分進まず、リガンド固定化量が少ない。そのため、分離能は実施例1、2の本発明品より遙かに劣っているのである。

評価方法：

耐圧性評価法：上記カラムにスラリー法にて各分離剤を充填する時、分離剤が液圧で押し潰され、カラムの閉塞が起きる時の液流量。

(単位：ml/min..)

D体、L体のピーク巾を示す)

結果を第1表に示した。

4. 図面の簡単な説明

第1図は実施例におけるODPA分離のクロマトチャートを示す。

>10は10ml/min以上の液流量でも、分離剤は押し潰されずカラムの閉塞が起きないことを示す。

分離能評価法：

液体クロマトグラフィーによる、D、L-ジヒドロキシフェニルアラニン(通称DOPA)の光学分割を行い、各分離剤の分離能を比較した。クロマトグラフィーのピークは第1図に示したごとくである。

カラム：4.6mmφ×150mmステンレスカラム

分離剤径：37~74μm

溶離液：(15mM酢酸+0.6mM酢酸銅)/

L溶液

分離能

$$R_s : R_s = t_{R2} / t_{R1}$$

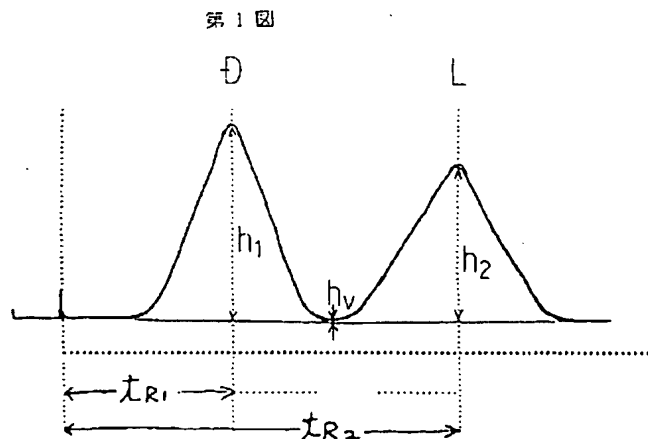
$$R_s : (h_1 + h_2 - 2h_v) / (h_1 + h_2)$$

$$R_s : \text{分離度 } R_s = 2(t_{R2} - t_{R1}) /$$

$$(W_1 + W_2)$$

(なお、W₁、W₂はそれぞれ

図1 図2



特許出願人 三井東圧化学株式会社